UNTERSUCHUNGEN AN EXTRAINTESTINALEN ENTWICKLUNGSSTADIEN (DORMOZOITEN) VON CYSTOISOSPORA RIVOLTA DER KATZE IN DER MAUS

Sabine Brösigke

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0017

Sofortdruck-Center Blasaditsch GmbH & Co KG · Kitzenmarkt 28 · 8900 Augsburg · Tel. (0821) 518563

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J.Boch

Untersuchungen an extraintestinalen Entwicklungsstadien (Dormozoiten) von Cystoisospora rivolta der Katze in der Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sabine Brösigke
aus
Augsburg

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

mes parents aimés

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Extraintestinale Entwicklungsformen von Cystoisospora-Arten der Katze (anhand der Literatur)	2
III.	Eigene Untersuchungen	
	A. Material und Methode	8
	B. Ergebnisse an experimentell infizierten Mäusen	11
	1. Lichtmikroskopische Darstellung von Dormozoiten	11
	2. Verteilung der Dormozoiten ...	17
	3. Infektiosität der Dormozoiten für die Maus	19
	4. Chemotherapeutische Beeinflußung der Dormozoiten	21
IV.	Besprechung der Ergebnisse	23
V.	Zusammenfassung	30
	Summary	31
VI.	Literaturverzeichnis	32

I. Einleitung

Die Hauskatze ist Endwirt für Kokzidienarten der Gattungen Besnoitia, Hammondia, Toxoplasma, Sarcocystis und Isospora. Diese Infektionen verlaufen bei der Katze, ausgenommen junge und geschwächte Tiere, in der Regel symptomlos. Medizinisch bedeutsam sind Toxoplasma-, wirtschaftlich wichtig Sarcocystis- und Besnoitia-Infektionen aufgrund der Schädigung der Zwischenwirte.
Die Isospora-Arten der Katze, I.rivolta und I.felis, wurden lange Zeit als obligat monoxene Darmparasiten mit direktem, faecal-oralem Infektionsmodus angesehen. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß ein fakultativ zweiwirtiger Zyklus existiert; deshalb werden beide Arten der Gattung Cystoisospora zugeordnet. Der Nachweis extraintestinaler Stadien im Zwischenwirt wird indirekt durch das biologische Fütterungsexperiment und direkt mit gefärbten Tupf-, Ausstrich- und histologischen Schnittpräparaten von Organen sowie elektronenmikroskopisch geführt. Ihre Bedeutung für die Epidemiologie der Cystoisospora-Infektion der Katze ist bisher unklar.
Es war das Ziel vorliegender Arbeit, bei experimentell mit Cystoisospora rivolta infizierten Mäusen Einzelheiten der Entwicklung dieser extraintestinalen Formen zu untersuchen.

II. Extraintestinale Entwicklungsformen von Cystoisospora-Arten der Katze (anhand der Literatur)

Die Hauskatze (Felis silvestris var. domestica) ist der Endwirt für zwei Spezies aus der Gattung Isospora, I.rivolta (Grassi, 1879) Wenyon 1923 und I.felis Wenyon 1923.

FRENKEL und DUBEY (1972) entdeckten, daß für beide Arten ein fakultativ zweiwirtiger Entwicklungszyklus existiert. In verschiedenen Zwischenwirten und im Endwirt selbst konnten in extraintestinalen Geweben Parasitenstadien nachgewiesen werden, die bei Verfütterung an empfängliche Katzen eine Kokzidiose hervorriefen. MARKUS (1976) prägte für diese Stadien den Begriff Dormozoiten. Andere Namen dafür sind monozoic cysts (FRENKEL, 1977), Hypnozoiten (MARKUS, 1978) und zoites (DUBEY, 1979). Aufgrund der neuen Erkenntnisse wurde vorgeschlagen, jene Isospora-Arten, für die ein fakultativ heteroxener Zyklus nachgewiesen wurde, einer neuen Gattung zuzuordnen und den alten Begriff "Isospora" nur noch für obligat homoxene Spezies zu verwenden. DUBEY (1977) empfahl den Namen Levineia, FRENKEL (1977) Cystoisospora, wobei sich letzterer in der Literatur durchgesetzt hat (ROMMEL, 1978; FAYER und FRENKEL, 1979; HEYDORN, 1979; FERGUSON et.al., 1980; MEHLHORN und FRENKEL, 1980; WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN, 1980).

Analoge Entwicklungszyklen wurden auch für die drei Isospora-Arten des Hundes, I.canis (DUBEY, 1975 a), I.ohioensis (DUBEY und MEHLHORN, 1978), I.burrowsi (ROMMEL und ZIELASKO, 1981) sowie für die spezifische Art des Frettchens I.laidlawi (HEINE, 1981) nachgewiesen.

In vorliegender Arbeit werden die Begriffe Cystoisospora und Dormozoit verwendet.

Das untersuchte Zwischenwirtspektrum der felinen Cystoisospora-Arten umfaßt Rodentia, Carnivora und Ruminantia.
Erstmalig wiesen FRENKEL und DUBEY (1972) nach, daß Mäuse, Ratten und Hamster als Vektoren für C.rivolta und C.felis dienen können. In folgenden Untersuchungen zeigten DUBEY und FRENKEL (1972), daß Dormozoiten dieser Arten auch in extraintestinalen Geweben des Endwirtes Katze vorkommen. Als weitere Zwischenwirte von C.rivolta und C.felis wurden Hund (DUBEY, 1975 a; DUBEY, 1975 b) und Kalb (FAYER und FRENKEL, 1979) nachgewiesen. WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN (1980) fanden C.felis-Entwicklungsstadien auch in Schlachtkühen.
Der Nachweis extraintestinaler Stadien von C.rivolta und C.felis gelingt indirekt im biologischen Fütterungsexperiment (Tierversuch). Kokzidienfreien Zwischenwirten werden Oozysten oder Sporozysten oral verabreicht. Definierte Zeiten nach der Infektion sind diese Tiere zu töten und Suspensionen ihrer inneren Organe an eine kokzidienfreie Katze zu verfüttern, deren Kot dann auf die Ausscheidung von Oozysten hin untersucht wird.
C.rivolta-Dormozoiten ließen sich auf diese Weise in inneren Organen von

- Mäusen, Ratten und Hamstern (FRENKEL und DUBEY, 1972; DUBEY, 1979)
- Hunden (DUBEY, 1975 b)
- Kälbern (FAYER und FRENKEL, 1979)
- Katzen (DUBEY und FRENKEL, 1972) nachweisen.

Dormozoiten von C.felis wurden bei

- Mäusen, Ratten und Hamstern (FRENKEL und DUBEY, 1972)
- Hunden (DUBEY, 1975 a)
- Kälbern (FAYER und FRENKEL, 1979)
- Schlachtrindern (WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN, 1980)

- Katzen (DUBEY und FRENKEL, 1972) gefunden.
Direkt können Dormozoiten in gefärbten Tupf- und Ausstrichpräparaten, in histologischen Schnitten extraintestinaler Gewebe sowie elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.
Extraintestinale Stadien von C.rivolta wurden in nach Giemsa gefärbten Tupfpräparaten der Mesenteriallymphknoten von Katze und Maus (FRENKEL und DUBEY, 1972 ; DUBEY und FRENKEL, 1972; DUBEY, 1979), seltener in Tupfpräparaten und histologischen Schnitten der Milz von Mäusen (DUBEY, 1979) gefunden. Dormozoiten von C.felis ließen sich in Tupfpräparaten der Mesenteriallymphknoten von Katze und Maus (DUBEY und FRENKEL, 1972; FRENKEL und DUBEY, 1972) und histologisch in Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz von Mäusen (WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN, 1980) nachweisen.
Im Vergleich zum umgebenden Wirtsgewebe färben sich extraintestinale Stadien, im Gegensatz zu intestinalen, nur schwach an (FRENKEL und DUBEY, 1972; DUBEY und FRENKEL, 1972).
HEINE (1981) gelang der direkte Nachweis von Dormozoiten in tryptisch verdauten Organen von mit C.rivolta und C.felis experimentell infizierten Mäusen.
Zur Morphologie von Dormozoiten geben FRENKEL und DUBEY (1972) an, daß die extraintestinalen Stadien beider Spezies während der ersten Woche post infectionem frei und innerhalb lymphoretikulärer Zellen zu finden sind. Für C.felis wurden in Mesenteriallymphknoten der Maus Dormozoitengrößen von 7-10 x 6-8 µm (1.-4. Tag p.i.) bis 13-26 x 6-11 µm am 5. Tag p.i. (FRENKEL und DUBEY,1972) und in Lymphknoten der Katze 10-12 x 4-10 µm am 2.-4. Tag p.i. (DUBEY und FRENKEL, 1972) festgestellt. DUBEY (1979) untersuchte gefärbte Tupfpräparate der Mesenteriallymphknoten von mit C.rivolta-Sporozysten infizierten Mäusen. Er registrierte eine Größenzunahme der Dormozoiten von 6-8 x 4-6 µm am 1. Tag p.i. auf 11-17 x

6-9 µm am 31. Tag p.i.
C.felis-Dormozoiten lagen einzeln und paarweise, während die von C.rivolta nur einzeln vorkamen (FRENKEL und DUBEY, 1972). Allerdings berichten DUBEY und FRENKEL (1972) in späteren Untersuchungen, daß extraintestinale Stadien von C.felis gruppenweise und von C.rivolta paarweise liegen. Am 4. und 5. Tag p.i. waren einige Dormozoiten von hüllenähnlichen Strukturen (FRENKEL und DUBEY, 1972; DUBEY und FRENKEL, 1972; DUBEY, 1979), ab dem 7. Tag die Mehrzahl der Stadien von einer deutlichen Hülle umgeben, deren Größe bei C.rivolta mit 18-30 x 8-13 µm am 31. Tag p.i. (DUBEY, 1979) und bei C.felis mit 21-35 x 7-14 µm am 5. Tag p. i. (FRENKEL und DUBEY, 1972) angegeben wird. Während eines zweijährigen Untersuchungszeitraumes traten keine Veränderungen dieser Strukturen auf (DUBEY, 1979).

MEHLHORN und MARKUS (1976) untersuchten die Ultrastruktur von C.felis-Dormozoiten. Sie konnten keine meßbaren Grössenzunahmen feststellen. Die Dormozoiten ähnelten in ihrer Form den Sporozoiten und wiesen deren typische Organellen (Conoid mit Mikrotubuli und Rhoptrien) auf. Hinter dem Nukleus befand sich ein Kristalloidkörper, was darauf hindeutet, daß keine Vermehrung stattfindet. Die Dormozoiten lagen stets einzeln innerhalb der Wirtszelle, von deren Cytoplasma sie eine parasitophore Vakuole trennte. Die Untersucher unterscheiden 3 Typen parasitophorer Vakuolen, je nach deren Größe und der Anordnung darin enthaltener elekronendichter Granula.
Die Weiterentwicklung der Dormozoiten im Zwischenwirt ist umstritten. FRENKEL und DUBEY (1972) sowie DUBEY und FRENKEL (1972) vermuten aufgrund ihrer lichtmikroskopischen Beobachtungen, daß eine Vermehrung in Form einer Zweiteilung der Dormozoiten stattfände; dies hält auch MARKUS (1975) innerhalb der ersten 25 Tage p.i. in begrenzter Form für möglich. FRENKEL (1974) meint, auch die "monozoitische Zyste" würde vom Parasiten gebildet.

Diese Annahme wurde jedoch von MEHLHORN und MARKUS (1976) sowie WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN (1980) nicht bestätigt und von DUBEY und MEHLHORN (1978) sowie DUBEY (1979) korrigiert.
Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die Präpatenz bei C.rivolta-Infektionen stets 5-7 Tage beträgt, gleich ob die Katzen mit Oozysten oder Dormozoiten-enthaltenden Organen infiziert wurden. Bei C.felis beträgt sie nach Dormozoiten-induzierten Infektionen 4-6 Tage und nach Oozysteninokulation 7-11 Tage (DUBEY und FRENKEL, 1972; DUBEY und STREITEL, 1976). Die intestinale Entwicklungsdauer von C.rivolta in der Katze gibt DUBEY (1979) mit 12-24 Stunden länger an, wenn die Tiere mit Oozysten, anstatt mit Dormozoiten aus Mäuseorganen, infiziert wurden. Die Präpatenz sowie die Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten war in jedem Fall gleich.

Die Bedeutung der extraintestinalen Stadien für die Epidemiologie der felinen Cystoisospora-Infektionen ist umstritten. Die Infektionsfähigkeit der Dormozoiten in der Maus ist bei C.felis für 18 Monate (WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN, 1980) und bei C.rivolta für 23 Monate (DUBEY, 1979) bewiesen. Die extraintestinalen Stadien stellen damit ein homoiothermes Reservoir (FRENKEL und DUBEY, 1972) dar, das den Parasiten vor schädigenden Einflüssen der Umgebung schützt und aufgrund der Mobilität der Zwischenwirte seiner Weiterverbreitung dient (FRENKEL, 1974). Der auf reduzierter metabolischer Rate lebende Dormozoit kann so länger als andere Entwicklungsstadien überdauern (FAYER, 1980).
Eine Infektiosität der Dormozoiten für weitere Zwischenwirte besteht nicht (FRENKEL, 1974). DUBEY (1979) versuchte, extraintestinale Stadien von C.rivolta intraperitoneal auf Mäuse zu übertragen, eine Passagierung gelang jedoch nicht.
Eine Pathogenität der Dormozoiten von C.rivolta und C.felis für Zwischenwirte scheint nicht zu bestehen.

FAYER und FRENKEL (1979) infizierten Kälber mit C.felis- und C.rivolta-Oozysten und untersuchten Gewichtszunahme, Haematokrit, Körpertemperatur und nach Tötung der Tiere histologische Schnitte verschiedenster Organe. Sie konnten keinerlei Anzeichen einer klinischen Erkrankung oder von Gewebeläsionen feststellen. Auch Mäuse, die mit C.felis-Oozysten inokuliert waren, zeigten keine Krankheitssymptome (WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN, 1980). Allerdings schließen FRENKEL und DUBEY (1972) sowie FAYER (1980) nicht aus, daß Dormozoiten bei sehr empfänglichen oder immunsuppressiven Tieren doch Krankheiten hervorrufen können.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methode

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche, 20-35 g schwere Schwarzmäuse. Diese einer Kreuzung aus NMRI-Maus und Hausmaus entstammenden Tiere sind gegenüber Kokzidieninfektionen besonders empfänglich (HEINE, 1981). Die Mäuse wurden in sterilisierten Makrolonkäfigen auf entstaubter Einstreu (Altromin, Altrogge Lage-Lippe) gehalten. Sie bekamen ad libitum Wasser und standardisierte Nagerpellets (Altromin). Die Kontrolltiere waren den gleichen Bedingungen unterworfen.

Zur Oozystenproduktion dienten institutseigene, koproskopisch kokzidienfreie Versuchskatzen, zur Überprüfung der Infektiosität der Dormozoiten standen kokzidienfreie Katzen (SPF-Züchtung, Kategorie 4) aus dem Institut für wissenschaftliche Versuchstierzucht Geretsried zur Verfügung. Die geimpften (Feliniffa P und HC, Iffa Merieux) und entwurmten (Banminth, Pfizer) Katzen waren 2-4 Monate alt. Sie erhielten handelsübliches, steriles Dosenfutter und frisches Wasser ad libitum. Alle Tiere wurden einzeln in sterilisierten Käfigen auf täglich 1-2 mal erneuertem Zellstoff gehalten. Mit der $ZnCl_2$-NaCl-Flotationsmethode untersuchte ich den Kot jeden Tag auf Kokzidienoozysten.

Als Infektionsmaterial dienten aus den Faezes einer natürlich infizierten Katze isolierte Cystoisospora rivolta-Oozysten. Meine experimentell infizierten Versuchskatzen erhielten 5-10 x 10^4 sporulierte Dauerstadien. Zur Steigerung der Oozystenausscheidung wurde versucht, die Infektabwehr von 6 Tieren zu schwächen. 3 Katzen erhielten Röntgenstrahlen von 100, 200 bzw. 300 R (60 kV, 30 mA) ; Herrn Prof. Dr. Tempel, Institut für Pharmakologie und Toxokologie danke ich für seine Unterstützung.

Weiteren 3 Tieren wurde das Depotcorticosteroid Celestan (Byk Essex) in einer Dosierung von 2 mg Betamethasondi - natriumphosphat + 1,5 mg Betamethasonacetat / kg KGW injiziert. Alle Versuchskatzen schieden nach einer Präpatenz von 5-7 Tagen C.rivolta-Oozysten 1-3 Wochen lang aus.

Die Oozystengewinnung aus den Faezes erfolgte mit Hilfe der Flotationsmethode. Der Kot wurde in einer $NaCl/ZnCl_2$-Lösung (spezifisches Gewicht 1,3 g/cm^3) mit einem elektrischen Mixer intensiv verrührt, die Suspension gesiebt (Maschenweite 400 µm) und 5 Minuten bei 1000 U/min (180 g) zentrifugiert. Die flotierten Oozysten saugte ich mit einer im Winkel von 45° abgebrochenen Pasteurpipette unter Zwischenschaltung eines Kunststoffschlauches ab. Um die Oozystenausbeute zu erhöhen, wurde dieses Verfahren mit dem resuspendierten Sediment wiederholt. Nach 3-maligem Auswaschen der Oozystensuspension erfolgte über ein Sieb (Nylongaze, 50 µm Maschenweite) eine weitestgehende Reinigung von Kotpartikeln. Danach wurde die Suspension unter Zusatz einiger Tropfen 2 %iger $K_2Cr_2O_7$ in Petrischalen bei 20-23° C zur Sporulation aufgestellt, die nach einer Woche abgeschlossen war.

Die Anzahl der sporulierten Oozysten in 5 µl bestimmte ich mikroskopisch bei 160 facher Vergrößerung und rechnete dann auf das Gesamtvolumen um. Das Material wurde bei 4° C im Kühlschrank gelagert und vor der Inokulation der Mäuse das $K_2Cr_2O_7$ aus ihm ausgewaschen. Zum Zeitpunkt der Infektion der Mäuse waren die Oozysten maximal 8 Wochen alt.

Die Inokulation der Versuchsmäuse erfolgte oral mit einer als Magensonde dienenden Knopfkanüle. Je nach Versuch betrug die Infektionsdosis 10^5 -10^7 sporulierte Oozysten. 10^5 -10^6 Dauerstadien wurden in einem Volumen von 0,5 - 0,8 ml, 10^7 Oozysten in 5 ml (verteilt über 3 Tage) appliziert. Die Versuchstiere isolierte ich dann für zwei Tage, um Schmierinfektionen weitestgehend auszuschließen.

Der Nachweis der Dormozoiten in Mäusen erfolgte mit der tryptischen Verdauung. Das zu untersuchende Gewebe wurde mit dem Skalpell feinst zerschnitten und mit 10 ml einer stets frisch zubereiteten 0,5 %igen Trypsinlösung (Difco Nr. 0152-15 in PBS, pH 7,4) in einem 25 ml Erlenmeyerkolben versetzt. Die Organsuspension inkubierte ich 3 Stunden bei 20-25° C unter Einsatz eines Magnetrührers. Danach wurde mit einem Sieb (0,5 µm Maschenweite) abgeseiht, bei 1000 U/min (180 g) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig auf 0,5-1 ml Suspensionsvolumen abgesaugt und das Sediment gründlich resuspendiert. In 5 µl zählte ich die Dormozoiten im Deckglaspräparat bei 160-facher Vergrößerung (Objektiv : Leitz Wetzlar, NPL FL 16/0,45) aus. Die Dormozoitenanzahl pro Organ (D_o) ergibt sich aus der Formel $D_o = n \times 200 \times V$ (n = Anzahl, der in 5 µl gezählten Dormozoiten ; V = Suspensionsvolumen in ml).

Teilweise nahm ich eine semiquantitative Auswertung vor. Dazu wurden 5 µl der Suspension untersucht und wie folgt bewertet: 1-10 Dormozoiten = + schwacher Befall; 10-20 Dormozoiten = ++ mäßiger Befall; 20-40 Dormozoiten = +++ mittelgradiger Befall; mehr als 40 Dormozoiten = ++++ hochgradiger Befall.

Von Milz und Leber fertigte ich teilweise Tupf- und Ausstrichpräparate an und färbte sie nach Giemsa. Formalinfixierte Stücke von Leber und Milz wurden in Paraffin eingebettet und 3-5 µm dicke Schnitte mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt (Diese histologischen Arbeiten erfolgten dankenswerter Weise im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern Oberschleißheim).

B. Ergebnisse an experimentell infizierten Mäusen

In den verschiedenen Einzelexperimenten wurden die Dormozoiten lichtmikroskopisch dargestellt, ihre qualitative und quantitative Verteilung in der Maus untersucht, deren Infektiosität für den fakultativen Zwischenwirt überprüft sowie ihre mögliche Beeinflussung durch Chemotherapeutika versucht.

1. Lichtmikroskopische Darstellung von Dormozoiten

Nach dreistündiger tryptischer Verdauung von Organen und Geweben experimentell infizierter Mäuse war das Material bei mikroskopischer Betrachtung weitgehend homogen. C.rivolta-Dormozoiten stellten sich als bananenförmige Gebilde dar, die ein stumpfes und ein spitzer erscheinendes Ende aufwiesen (Abb. 1).

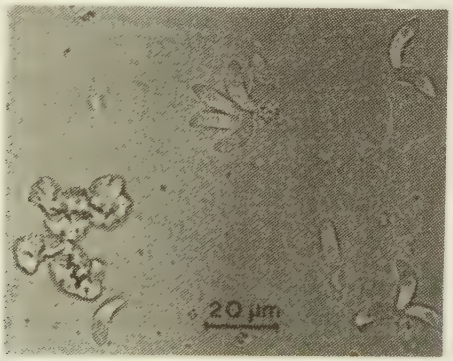

Abb. 1 : Cystoisospora rivolta-Dormozoiten im tryptisch verdauten Gekröse einer Maus, 7 Tage p.i.

Die Wandstruktur war glatt und stark lichtbrechend. Von dem granulären Inhalt hob sich deutlich eine runde, im ersten Drittel des Zoiten gelegene Zone ab. Bis zum 4. Tag p.i. wölbte sich die Wand einzelner Dormozoiten im Bereich die-

ser homogen erscheinenden Struktur vor, wodurch der Eindruck einer Dreiteilung des Zoiten entstand (Abb. 2).

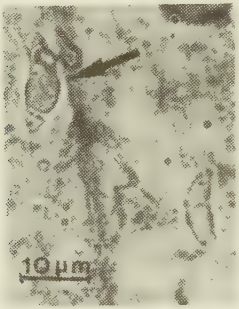

Abb. 2 : Cystoisospora rivolta-Dormozoiten in der tryptisch verdauten Milz einer Maus, 2 Tage p.i.;deutliche Dreiteilung bei einem der beiden Zoiten (Pfeil)

Diese Dormozoiten zeigten mehr oder weniger starke Beweglichkeit; sie drehten sich um die Längsachse, verkürzten sich, knickten an einem Körperende ab oder bewegten sich aktiv vorwärts. Dabei kam es teilweise zu erheblichen Gestaltsveränderungen, sodaß gedrungene, rundliche, kurze bis schlanke, spitze oder längliche Formen beobachtet wurden. Teilweise fixierten sich Dormozoiten mit ihrem spitzen Ende am Deckglas. Bei über 14 Tage alten Parasiten wurden bewegliche Formen seltener; trotzdem konnten auch am 168. Tag p.i. noch vereinzelt Bewegungen festgestellt werden (Abb. 3).

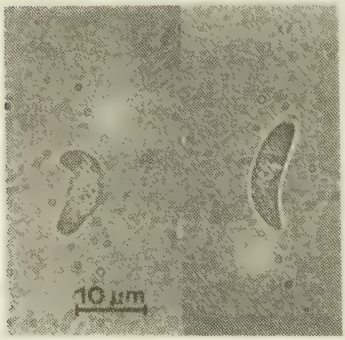

Abb. 3 : Bewegliche Cystoisospora rivolta-Dormozoiten aus tryptisch verdautem Milzgewebe einer Maus,14 Tage p.i.

Um die Infektiosität dieser Dormozoiten für den Endwirt zu prüfen, wurden Leber, Milz und Gekröse einer 168 Tage zuvor mit 10^5 Oozysten infizierten Maus an eine kokzidienfreie Katze verfüttert; diese schied nach 6 Tagen 9 Tage lang C.rivolta-Oozysten aus.
Die Größe gestreckter Dormozoiten betrug am 2. Tag p.i. 11,6-14,5 x 2,9-3,0 µm. Am 7. Tag p.i. traten vereinzelt hüllenähnliche Strukturen um den Parasiten auf. Diese waren elliptisch geformt, wirkten homogen und ließen sich, im Gegensatz zu den Dormozoiten, mit 1 %iger wässriger Methylenblaulösung anfärben. Die äußere Begrenzung war glatt, der zentral gelegene Dormozoit in seiner Position fixiert (Abb. 4).

Abb. 4: Hüllenstruktur um einen Cystoisospora rivolta-Dormozoiten aus der Milz einer Maus, 7 Tage p.i.

Der gesamte Hüllkörper hatte am 7. Tag p.i. Ausmaße von 21,7-25,0 x 9,3-10,0 µm, erreichte am 28. Tag p.i. 24,8-28,0 x 11,6-12,4 µm und vergrößerte sich dann (bis zum 168. Tag p.i.) nicht mehr. Der umhüllte eigentliche Dormozoit veränderte nach dem 7. Tag p.i. seine Größe von 15,5-17,4 x 3,0-4,6 µm nicht. Am 28. Tag p.i. sind ca. 10 % der Dormozoiten von Hüllen umgeben, am 84. und 168. Tag p.i. waren es 50-70 % .
In tryptisch verdautem Organmaterial konnte man häufig beobachten, wie Dormozoiten aus den Hüllen frei wurden. Sie traten mit dem stumpfen Ende zuerst aus, wurden in ihrer Mitte scheinbar eingeschnürt und lagen schließlich frei außerhalb der Hülle (Abb. 5).

Abb.5: Freisetzen eines Cystoisospora rivolta-Dormozoiten aus seiner Hülle (tryptisch verdautes Gekröse einer Maus, 28 Tage p.i.); deutlich erkennbare Einschnürung des Zoiten (Pfeile)

Ab dem 84. Tag p.i. waren etwa 10-20 % leere Hüllen zu sehen, die sich intensiv mit Methylenblau anfärben ließen (Abb. 6).

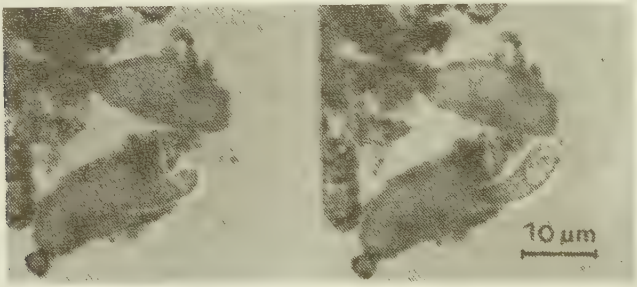

Abb. 6 : Freisetzen eines Cystoisospora rivolta-Dormozoiten aus seiner Hülle; tryptisch verdautes Gekröse einer Maus, 84 Tage p.i.

Zur histologischen Untersuchung wurden 4 Mäuse mit je 2×10^6 und eine Maus mit 10^7 sporulierten Oozysten infiziert und am 3., 7., 28. und 84. bzw. am 7. Tag p.i. getötet. In den HE-gefärbten Schnittpräparaten von Milz und Leber ließen sich bei allen 5 Tieren Dormozoiten nachweisen. Sie maßen durchschnittlich 14,5 x 3,0 µm

am 3. und 7. Tag p.i. bzw. 15,5-16,4 x 4,6-5,3 µm am 28. und 84. Tag p.i. , während die ab dem 7. Tag p.i. vorkommenden Hüllen 18,6-21,0 x 9,3-11,0 µm groß waren. Die granulären Kernstrukturen der Dormozoiten waren rötlich gefärbt,die Parasiten lagen intrazellulär (Abb.7).

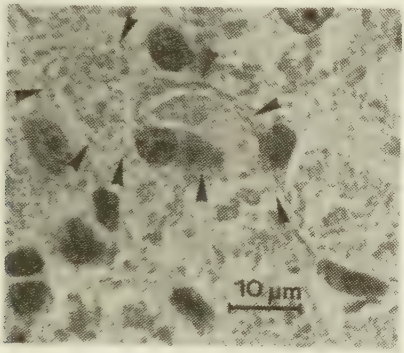

Abb.7 : Intrazellulär gelegener Cystoisospora rivolta-Dormozoit in der Leber einer Maus,7 Tage p.i.; histologischer Schnitt von 3 µm Dicke, Haematoxilin-Eosin-Färbung; Zellgrenze mit Pfeilspitzen markiert

In nach Giemsa gefärbten Tupfpräparaten von Leber und Milz hatten die Dormozoiten Größen von 12,4-15,5 x 3,1-6,2 µm (7. Tag p.i.), während die Hüllen am 84. Tag p.i. 18,6 x 9,3 µm maßen. Auch hier konnte die intrazelluläre Lage verdeutlicht werden.
Schließlich untersuchte ich von der mit 10^7 Oozysten infizierten und am 7. Tag p.i. getöteten Maus Dormozoiten auch in Nativpräparaten von Leber, Milz und Gekröse. Dazu wurden kleine Stücke der Organe fein zerschnitten, in Ringerlösung suspendiert und mikroskopisch im Deckglaspräparat angesehen. Die Parasitenstadien unterschieden sich in Größe und Struktur nicht von denen, die sich nach tryptischer Organverdauung nachweisen ließen; allerdings waren häufig mehrere zusammengelagert (Abb. 8).

Abb. 8: Rosettenförmig aneinander gelagerte Cystoisospora rivolta-Dormozoiten im Gekröse einer Maus, 7 Tage p.i. ; nativ

Gelegentlich wurden Dormozoiten einzeln oder paarweise intrazellulär gefunden (Abb. 9).

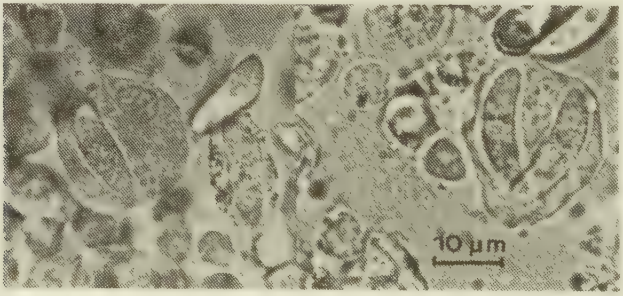

Abb. 9: Intrazellulär gelegene Dormozoiten von Cystoisospora rivolta im Gekröse einer experimentell infizierten Maus, 7 Tage p.i.

2. Verteilung der Dormozoiten

Nach oraler Infektion von 32 Schwarzmäusen (16 ♀ ,16 ♂) mit je 10^5 sporulierten C.rivolta-Oozysten wurden am 2., 3., 4., 7., 14., 28., 84. und 168. Tag p.i. jeweils 2 ♀ und 2 ♂ sowie ein Kontrolltier getötet, ihr Körpergewicht festgestellt und alle seziert. Milz, Leber, Darmgekröse, Peyersche Platten, Magen, Darm, Nieren, Zwerchfell, Herz, Lunge, Skelettmuskulatur (Glutäen- und Quadrizepsanteile) und Gehirn eines jeden Tieres wurden separat gewogen, tryptisch verdaut und auf Parasiten untersucht. Setzt man bei den 8 Sporozoiten jeder inokulierten Oozyste eine 100 %ige Infektiosität voraus, so läßt sich die Gesamtzahl der Dormozoiten pro Maus (D) in Prozent zur verabreichten Infektionsdosis durch die Formel

$$D\ \% = \frac{D \times 100}{8 \times \text{inokulierte Oozystenzahl}}$$ darstellen.

Die Gesamtdormozoitenanzahl pro Maus betrug bereits 2 Tage p.i. durchschnittlich 10.326 (D % = 1,29). Bis zum 168. Tag p.i. schwankte dieser Wert bei den insgesamt 32 untersuchten Mäusen (Tab. 1) von 7.476 - 38.679 Dormozoiten / Maus (D % = 0,9-4,8).

Als Prädilektionsorgane für Dormozoiten in der Maus erwiesen sich Gekröse, Milz, Leber und Peyersche Platten; in diesen Organen waren stets Parasiten nachweisbar (Tab. 2). Ausserdem fanden sich bei 3 der 32 Versuchsmäuse Erreger in der Lunge sowie bei 5 im Herzen. Am stärksten war das Gekröse mit 26 - 67 % befallen. Es folgten die Milz mit 7 - 50 %, die Leber mit 9 - 34 % und die Peyerschen Platten mit 0,03 - 16 % . Zusätzlich zu den Tieren, in deren Herz und Lunge sich schon bei 10^5 Oozysten/Tier Dormozoiten nachweisen ließen, zeigte sich bei einigen hochinfizierten Mäusen (2×10^6 und 1×10^7 Oozysten pro Maus), daß Zwerchfell, Muskulatur und Niere befallen sein können. Ferner wurden im Blut Dormozoiten am 7. Tag p.i. nachgewiesen. Das Gehirn blieb stets negativ.

Tage p.i.	Gesamtzahl der Dormozoiten je Maus und (Dormozoitengehalt im Verhältnis zur Infektionsdosis in Prozent) bei Maus...				
	1-8	9-16	17-24	25-32	Durchschnitt
2	11.880 (1.49)	7.476 (0.94)	12.050 (1.51)	9.900 (1.24)	10.326 (1.29)
3	13.884 (1.74)	19.300 (2.41)	6.000 (0.75)	15.190 (1.90)	13.593 (1.70)
4	14.690 (1.84)	15.450 (1.93)	19.296 (2.41)	18.880 (2.36)	17.079 (2.13)
7	11.644 (1.46)	38.679 (4.83)	29.840 (3.73)	23.560 (2.95)	25.930 (3.24)
14	24.560 (3.07)	18.258 (2.28)	21.850 (2.73)	26.022 (3.25)	22.672 (2.83)
28	30.416 (3.80)	28.354 (3.54)	31.476 (3.94)	29.620 (3.70)	29.966 (3.75)
84	13.725 (1.72)	17.954 (2.24)	25.884 (3.23)	24.000 (3.00)	20.391 (2.55)
168	9.358 (1.17)	21.700 (2.71)	19.810 (2.48)	16.400 (2.05)	16.817 (2.10)

Tab.1: Entwicklung des Gesamtdormozoitengehaltes in experimentell mit 100.000 Cystoisospora rivolta - Oozysten infizierten Mäusen

Tage p.i.	Durchschnittliche prozentuale Verteilung des Gesamtdormozoitengehaltes (jeweils 4 Mäuse) in			
	Milz	Leber	Gekröse	Peyersche Platten
2	8.89	9.08	67.31	16.73
3	54.41	32.30	12.13	0.56
4	37.71	18.71	43.54	0.03
7	44.07	28.61	26.48	0.83
14	30.46	25.73	44.51	1.23
28	39.78	27.60	36.14	1.29
84	14.42	34.47	50.89	0.20
168	21.65	15.96	62.35	0.04

Tab.2: Durchschnittliche prozentuale Verteilung des Gesamtdormozoitengehaltes in verschiedenen Organen der Maus am 2.-168. Tag nach experimenteller Cystoisospora rivolta-Infektion (100.000 Oozysten pro Tier)

3. Infektiosität der Dormozoiten für die Maus

Es erschien uns interessant, die Infektiosität von Dormozoiten aus der Maus für andere Mäuse (Mäusepassage) zu überprüfen. Dabei verfütterte ich einerseits aus Spendermäusen gewonnene Parasitenstadien an andere empfängliche Mäuse, andererseits untersuchte ich die Möglichkeit einer Übertragung auf den Fetus während der Gravidität.

12 Mäuse wurden mit je 10^5 sporulierten Oozysten von C.rivolta oral infiziert und am 3., 5., 7. und 14. Tag jeweils drei Tiere getötet. Milz und Leber jeder Maus wurden gewogen und halbiert. Einen Teil verdaute ich tryptisch, die darin enthaltenen Dormozoiten zählte ich aus und rechnete sie auf das Gesamtorgan um. Der andere Teil von Milz und Leber wurde feinst zerkleinert, in Ringerlösung suspendiert und 3 Stunden von einem Magnetrührer bewegt. Nach Siebung und Zentrifugation der Suspension inokulierte ich das verbleibende Milz-Leber-Sediment einer weiteren Maus, wobei jeweils 3000 - 9000 Dormozoiten/Maus oral gegeben wurden.

10 Tage später tötete ich diese "Passage"-Tiere, verdaute jeweils Milz, Leber, Gekröse, Peyersche Platten, Zwerchfell, Nieren, Herz, Lunge, Gehirn und Muskulatur getrennt tryptisch und untersuchte auf Dormozoiten. Interessanterweise fand ich nur solche Mäuse infiziert, welche Dormozoiten aus Organen von Mäusen erhielten, die 3, 5 bzw. 7 Tage zuvor C.rivolta-Oozysten verabreicht bekommen hatten; dabei waren die Dormozoiten wiederum in Gekröse, Leber und Milz nachweisbar. Bereits 14 Tage alte Dormozoiten führten dagegen, unabhängig von der Dosis, niemals zu einer Parasitenentwicklung in Passagemäusen (Tab. 3).

Hinsichtlich Größe und Struktur der Dormozoiten bestanden zwischen denen nach der Passage durch die Maus und den oozysteninduzierten Dormozoiten keine Unterschiede. Um

die Infektiosität der Parasiten aus Passagemäusen zu prüfen, wurden einer kokzidienfreien Katze Milz und Leber einer Maus gefüttert, die 10 Tage zuvor mit 7 Tage alten Dormozoiten infiziert worden war. Nach 6 Tagen schied sie 7 Tage lang C.rivolta-Oozysten aus.

Alter der Dormozoiten in der Spendermaus Tage	Anzahl der applizierten Dormozoiten je Passagemaus	Parasitenpositive Organe in der Passagemaus	Verhältnis der nachgewiesenen Dormozoitenzahl in der Spendermaus zur inokulierten Dormozoitenzahl %
3	3000	Milz,Leber Gekröse	8.5
	6000	Milz,Leber Gekröse	4.3
	9000	Milz,Gekröse	1.3
5	3500	Milz,Gekröse	2.0
	3600	Gekröse	1.38
	4500	Gekröse	0.4
7	5000	Leber,Gekröse	1.0
	6000	Milz,Leber Gekröse	0.6
	8500	Milz,Gekröse	0.58
14	4000	-	-
	5500	-	-
	6000	-	-

Tab.3: Experimentelle Übertragung von aus Mäuseorganen isolierten Cystoisospora rivolta-Dormozoiten auf Passagemäuse; Dormozoitennachweis mittels tryptischer Organverdauung am 10. Tag p.i.

Um den Einfluß der Gravidität des Zwischenwirtes auf Dormozoiten und deren eventuelle Übertragung auf den Fetus zu prüfen, wurden drei Gruppen weiblicher Mäuse zusammengestellt. 3 Mäuse waren bereits 97 Tage vor der Gravidität mit je 10^5 sporulierten C.rivolta-Oozysten inokuliert worden. Die zweite ebenfalls aus 3 Tieren bestehende Gruppe erhielt am 5. Trächtigkeitstag, die dritte Gruppe am 12. Tag der Gravidität jeweils 10^5 C.rivolta-Oozysten. Zwei Babymäuse jeden Wurfes wurden am 1. Tag post partum getötet und von ihnen Leber, Milz und gepoolt der restliche Körper tryptisch verdaut und auf Dormozoiten untersucht. Die übrigen Babymäuse jeder Gruppe wurden 2-6 Tage post partum an kokzidienfreie SPF-Katzen verfüttert.
In allen drei Gruppen konnten in den Babymäusen weder mit der tryptischen Verdauung noch im biologischen Fütterungsexperiment Dormozoiten nachgewiesen werden, obwohl in allen 9 Muttermäusen am Ende des Versuchs Dormozoiten mittels der tryptischen Verdauung festgestellt wurden.

4. Chemotherapeutische Beeinflußung der Dormozoiten

Schließlich sollten orientierende Untersuchungen über die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflußung von Dormozoiten durchgeführt werden. Hierzu wurden 16 Mäuse mit je 10^5 sporulierten C.rivolta-Oozysten oral infiziert und 8 davon therapiert. In den restlichen 8 Kontrollen verglich ich die Anzahl der Dormozoiten mit derjenigen der behandelten Gruppe. Als Chemotherapeutikum verwendete ich eine Kombination aus 0,25 mg / Tier / Tag Pyrimethamin (Daraprim^R , Wellcome) und 4 mg/ Tier / Tag Sulphamethoxypyridazin (Lederkyn^R , Novalis), die oral an 5 aufeinanderfolgenden Tagen appliziert wurden. 5 Tage nach der letzten Behandlung tötete ich die Mäuse, verdaute zehn Organe tryptisch und untersuchte Milz, Leber

Gekröse, Peyersche Platten, Zwerchfell, Nieren, Herz, Lunge, Muskulatur und Gehirn auf das Vorhandensein von Dormozoiten. Zwei Mäuse erhielten das Medikament 4 Stunden vor der Oozysteninokulation bis zum 4. Tag p.i. , zwei vom 5.-9. Tag p.i., zwei vom 20.-24. Tag p.i. und zwei vom 50.-54. Tag p.i. Es sollte damit die Wirksamkeit auf unterschiedlich alte Dormozoiten überprüft werden.

Während bei gleichzeitiger Verabreichung von Medikament und Inokulat eine geringe Beeinflußung der Dormozoiten zu bestehen schien, war die Medikamentierung bei Dormozoiten-positiven Mäusen, die 5-54 Tage p.i. fünf Tage lang behandelt worden waren, wirkungslos. Auch Größe und Aussehen der Dormozoiten bei therapierten Mäusen waren nicht verändert. Interessanterweise schied eine kokzidienfreie Katze nach Verfütterung von Dormozoiten-enthaltenden Organen von therapierten Mäusen (Applikation 0-4. Tag p.i.) nach einer Präpatenz von 6 Tagen für 12 Tage C.rivolta-Oozysten aus; zumindest mit den angewandten Therapeutika war die Infektion einer Katze mit Dormozoiten nicht zu verhindern, auch wenn diese gleichzeitig mit der Inokulation des Parasiten appliziert wurden.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Der Nachweis von C.rivolta-Dormozoiten gelang mit der tryptischen Organverdauung zuverlässiger als in gefärbten Tupf- und Ausstrichpräperaten sowie in histologischen Schnitten. Diese anderen Verfahren fielen grundsätzlich negativ aus, wenn die Mäuse nicht extrem hoch (2×10^6 - 10^7 Oozysten/Tier) infiziert worden waren. Erschwert wurde das Auffinden der Dormozoiten durch die auch von FRENKEL und DUBEY (1972) und DUBEY und FRENKEL (1972) erwähnte Tatsache, daß sich extraintestinale Stadien von Cystoisospora spp. schwächer als das umgebende Wirtsgewebe anfärben und daher leicht zu übersehen sind. Bei der tryptischen Verdauung hingegen wird der Zellverband zerstört, die Parenchymzellen werden weitestgehend eliminiert und dadurch die Dormozoiten angereichert. Diese Methode ist nach Angaben von HEINE (1981) auch zum Nachweis von Dormozoiten anderer Cystoisospora-Spezies (C.canis, C.ohioensis, C.burrowsi, C.felis, C.laidlawi) geeignet. Sie ist dem biologischen Fütterungsexperiment hinsichtlich Zeit und Aufwand überlegen.

In Tupf- und Ausstrichpräparaten von Milz, Leber und Mesenterium sowie in histologischen Schnitten von Milz und Leber experimentell mit 2×10^6 und 10^7 C.rivolta-Oozysten infizierter Mäuse liessen sich Dormozoiten nachweisen. FRENKEL und DUBEY (1972), DUBEY und FRENKEL (1972) und DUBEY (1979) fanden extraintestinale Stadien von C.rivolta lediglich in den Mesenteriallymphknoten von Maus und Katze, DUBEY (1979) in der Milz von Mäusen; im Gegensatz zu den eigenen Versuchen wurden von diesen Autoren allerdings nur 10^3 - 5×10^4 Oozysten pro Tier inokuliert.

Mit der tryptischen Organverdauung konnte erstmals aufgezeigt werden, welche Organe im einzelnen Dormozoiten enthalten. Es waren bei einer Infektionsdosis von 10^5 Oozysten/Tier stets das Mesenterium, die Milz, die Leber, häu-

fig die Peyerschen Platten sowie selten Herz und Lunge befallen. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Fütterungsversuchen überein, die immer dann positiv ausfielen, wenn die Organhomogenate Gekröse, Milz, Leber oder Mesenteriallymphknoten enthielten (FRENKEL und DUBEY, 1972; DUBEY, 1975 b; FAYER und FRENKEL, 1979); sie blieben negativ, wenn Hirn-Muskulatur- oder Lungenhomogenate verfüttert wurden (DUBEY und FRENKEL, 1972).

Bezüglich der Dormozoitenverteilung in den Organen der Maus bei höherer Infektionsdosis ($2 \times 10^6 - 10^7$ Oozysten/Tier) kann festgestellt werden, daß prinzipiell alle untersuchten Gewebe mit Ausnahme des Gehirns befallen sein können. Dies war bisher nicht bekannt, da nur gepoolte Organhomogenate in geringer Dosis verfüttert worden waren.

Insgesamt konnten durchschnittlich 0,9 - 4,8 % (eine theoretische Infektiosität aller 8 Sporozoiten der Oozyste vorausgesetzt) der inokulierten Sporozoiten als Dormozoiten in den extraintestinalen Organen der Versuchsmäuse nachgewiesen werden. Diese Zahl weist somit nicht auf eine Vermehrung der Stadien im fakultativen Zwischenwirt hin.

Endodyogenie-Stadien in lymphoretikulären Zellen, wie sie FRENKEL und DUBEY (1972), DUBEY und FRENKEL (1972) sowie MARKUS (1975) lichtmikroskopisch beobachteten, beobachtete ich nicht. Lediglich einmal konnten im nativ untersuchten Gekröse einer mit 10^7 Oozysten infizierten Maus 7 Tage p.i. 2 intrazellulär gelegene Dormozoiten gefunden werden. Da dies trotz des Massenbefalles mit Dormozoiten nur einmal auftrat, vermute ich, daß wahrscheinlich zwei Dormozoiten in dieselbe Zelle eingedrungen sind; auf diese Möglichkeit weisen auch MEHLHORN und MARKUS (1976) hin.

Aus den eigenen Beobachtungen über ein sofortiges hohes Auftreten von Dormozoiten im Mesenterium und in den Peyerschen Platten schließe ich, daß die Ausbreitung der Sporozoiten vom Duodenum aus lymphogen erfolgt. Elektronenmikroskopische Studien an C.felis-Dormozoiten zeigten, daß bei diesen sämtliche Organellen des Apicalkomplexes des Sporozoiten

vorhanden sind (MEHLHORN und MARKUS, 1976). Die nach dem 2. Tag p.i. ansteigenden Dormozoitenzahlen in Leber und Milz sowie ihr Vorkommen in Herz und Lunge wären mit einer retrograd auf dem Lymphweg stattfindenden Infektion nicht zu erklären. Es muß eine hämatogene Ausbreitung angenommen werden, was auch durch den Nachweis von Dormozoiten im Blut einer hochinfizierten Maus bestätigt werden konnte. Auf eine weitere Möglichkeit der Ausbreitung von Dormozoiten weisen HERNANDEZ und Mitarb. (1978) hin; sie konnten bei elektronenmikroskopischen Studien an Isospora lacacei extraintestinale Stadien in Makrophagen der Sinusoidkapillaren der Leber und in Rektikulumzellen der Milz feststellen. Dies deutet auf eine Phagozytose der Dormozoiten hin, wie sie auch bei Toxoplasma-Infektionen von JONES, YEH und HIRSCH (1972) beschrieben wurde. Offensichtlich vermögen die Dormozoiten die Blut-Liquor-Schranke nicht zu durchbrechen; das Gehirn blieb auch bei hoher Infektionsdosis stets parasitenfrei.

In den histologischen Schnitten von Leber und Milz fand ich C.rivolta-Dormozoiten intrazellulär gelegen. Dies stimmt mit elektronenmikroskopischen Studien an C.felis von MEHLHORN und MARKUS (1976) sowie an C.ohioensis von DUBEY und MEHLHORN (1978) überein. Auch in Tupfpräparaten fanden DUBEY und FRENKEL (1972), FRENKEL und DUBEY (1972) sowie DUBEY (1979) Dormozoiten von C.rivolta und C.felis sowohl intra- als auch extrazellulär.

Die Dormozoiten im tryptisch verdauten Gewebe erschienen als bananenförmige, z.T. bewegliche Gebilde mit stark lichtbrechender Hand. Kernstrukturen und vereinzelte Granula waren sichtbar. Die Größe nahm geringfügig von durchschnittlich 11,9 x 3,2 µm am 2. Tag p.i. auf 16,5 x 3,8 µm am 7. Tag p.i. zu. Die sich nach einer Woche entwickelnden Hüllstrukturen maßen durchschnittlich 23,4 x 9,7 µm am 7.Tag p.i. und 26,4 x 12,0 µm am 28.Tag p.i. Eine Veränderung fand danach nicht mehr statt. Diese Angaben liegen etwa im gleichen Bereich, wie sie DUBEY (1979) für Dormozoiten

von C.rivolta machte; er stellte eine leichte Größenzunahme der Dormozoiten und Hüllen fest. Beim Vergleich solcher Maße ist jedoch zu beachten, daß Dormozoiten in Tupfpräparaten plumper und kürzer erscheinen als in histologischen Schnitten, und daß sie in verdautem Material infolge ihrer Beweglichkeit die Gestalt ändern können.

Inwieweit die Beweglichkeit von Dormozoiten aus einer Aktivierung durch die Trypsineinwirkung resultiert und ob ihre aktive Bewegungsfähigkeit auf eine Infektiosität dieser Stadien für die Katze schliessen läßt, ist ungeklärt.

FRENKEL und DUBEY (1972), DUBEY und FRENKEL (1972) sowie FRENKEL (1974,1977) vermuteten aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen, daß die den felinen Cystoisospora-Dormozoiten umgebende Hülle vom Parasiten selbst gebildet würde. Elektronenmikroskopische Studien an extraintestinalen Stadien von C.felis (MEHLHORN und MARKUS, 1976) und von C.ohioensis (DUBEY und MEHLHORN, 1978) zeigten jedoch, daß es sich bei dieser Hülle um eine von der Wirtszelle gebildete parasitophore Vakuole handelte. Der den Parasiten vom Cytoplasma abgrenzenden einschichtigen Membran können elektronendichte Granula anliegen, wodurch lichtmikroskopisch der Eindruck einer Zyste oder Scheide hervorgerufen wird. Die Grenzmembran ist nicht verdickt, auch fehlt eine beträchtliche Größenzunahme des Parasiten innerhalb der Vakuole (MEHLHORN und MARKUS, 1976; DUBEY und MEHLHORN, 1978). MEHLHORN und FRENKEL (1980) verglichen die Ultrastruktur der Zysten und Zoiten von Toxoplasma, Sarcocystis, Hammondia, Besnoitia und Cystoisospora und stellten für Cystoisospora entwicklungsbiologisch die einfachste monozoitische Form fest.

Dormozoiten von Cystoisospora spp. sind als "Wartestadien" anzusehen(MEHLHORN und MARKUS, 1976 ; FAYER, 1980). Deshalb bezeichnete FAYER (1980) die Tiere, die Dormo-

zoiten beherbergen, als Transportwirte. Eine Weiterentwicklung der Dormozoiten ist, mit Ausnahme einer geringfügigen Größenzunahme bisher nicht bewiesen. Nimmt man dies als Kriterium, so kann der Dormozoiten-beherbergende Wirt auch als fakultativer Zwischenwirt (ROMMEL, 1978; DUBEY, 1979) bezeichnet werden. Das erweiterte Wirtsspektrum bietet dem Parasiten, der nicht ausschließlich vom Endwirt abhängt, eine zusätzliche Chance für sein Fortbestehen. Bei felinen Cystoisospora-Arten ist die Spezifität im Bereich des Endwirtes streng, jedoch weit, was die fakultativen Zwischenwirte angeht (EUZEBY, 1980). Der Parasit ist vor ungünstigen klimatischen Einflüssen geschützt und seine Verbreitung aufgrund des Jäger-Beute-Verhaltens gewährleistet.

DUBEY und FRENKEL (1972) sowie DUBEY und STREITEL (1976) stellten fest, daß die Präpatenz für C.rivolta bei Oozysten- sowie bei Dormozoiten-induzierten Infektionen der Katze gleich lang ist. Dies konnte in eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Im allgemeinen entwickeln Katzen nach überstandener C.rivolta-Infektion eine Immunität; trotzdem kam es bei zwei meiner Versuchskatzen, die eine Woche nach abgelaufener Patenz Dormozoiten-enthaltende Mäuse gefüttert bekamen, nach 6 Tagen erneut zur Ausscheidung von Oozysten. Dies kann auf einen Immunitätsdurchbruch hindeuten, muß aber noch genauer untersucht werden. Ob eine Reinfektion der Katze durch die in ihren extraintestinalen Organen möglichen Dormozoiten auf dem Blut- und Lymphwege möglich ist (EUZEBY, 1980), bleibt ebenfalls noch abzuklären.

Um die epidemiologisch interessante Frage zu klären, ob C.rivolta-Dormozoiten, ähnlich wie Toxoplasmen bei Mäusen, diaplazentar übertragbar sind, wurden weibliche Mäuse vor und in verschiedenen Stadien der Gravidität oral mit C.rivolta-Oozysten infiziert. In keinem Fall

konnten Dormozoiten in den Babymäusen im Fütterungsversuch und durch tryptische Organverdauung nachgewiesen werden.

Die Möglichkeit der Übertragung von Dormozoiten auf einen weiteren Zwischenwirt wird von FRENKEL (1974) und DUBEY (1979) ausgeschlossen. In meinen Versuchen konnte ich jedoch Dormozoiten aus Milz und Leber von Mäusen bis zum 7.Tag p.i. oral auf andere Mäuse übertragen und in deren Milz, Leber und Gekröse erneut nachweisen. Solchermaßen passagierte Dormozoiten waren für eine Katze infektiös. Ab einem Alter von 14 Tagen waren die Dormozoiten von C.rivolta jedoch nicht mehr in der Lage, bei oraler Inokulation erneut in extraintestinale Organe einzudringen. Möglicherweise reichen ab diesem Zeitpunkt die Energiereserven des Dormozoiten zwar noch für ein aktives Eindringen in das Darmepithel des adäquaten Endwirtes, nicht aber für die Wanderung in einem fakultativen Zwischenwirt aus.

Eine chemotherapeutische Beeinflußung der C.rivolta-Dormozoiten in der Maus erwies sich bei orientierenden Untersuchungen als wirkungslos. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Medikament und Oozysten war zwar die Dormozoitengesamtzahl in den Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer, jedoch wurde die Infektiosität der noch vorhandenen Dormozoiten nicht beeinträchtigt, wie ein positiv verlaufender Fütterungsversuch an Katzen ergab. Eingesetzt wurde Sulphamethoxypiridazin und Pyrimethamin, eine von APT und Mitarb. (1978) erfolgreich gegen die Toxoplasmose bei Mäusen angewandte Kombination.

Eine Pathogenität von C.rivolta-Dormozoiten für die Maus konnte ich nicht feststellen. Auch bei einer Infektionsdosis von 10^7 Oozysten/Tier traten klinische Symptome niemals auf. Dies stimmt mit Angaben von WOLTERS, HEYDORN und LAUDAHN (1980) sowie von FAYER und FRENKEL

(1979) überein; auch sie konnten bei Zwischenwirten keine Schäden infolge feliner Cystoisospora-Infektionen beobachten.

V. Zusammenfassung

Der Nachweis von extraintestinalen Stadien in experimentell mit 10^5 - 10^7 Cystoisospora rivolta-Oozysten oral infizierten Mäusen gelang direkt mit der tryptischen Organverdauung, vereinzelt in gefärbten Tupf-, Ausstrich- und histologischen Schnittpräparaten sowie indirekt im Fütterungsexperiment mit Katzen.
Dormozoiten sind im tryptisch verdauten Material bananenförmig, teilweise beweglich und 15,5 x 4,6 µm groß; 7 Tage post infectionem traten Hüllstrukturen (parasitophore Vakuolen) auf.
Prädilektionsstellen für Dormozoiten sind Mesenterium, Milz, Leber, Peyersche Platten, seltener Herz und Lunge. Bei einer Infektionsdosis von 10^5 Oozysten pro Maus fanden sich 26-67 % im Gekröse, 7-50% in der Milz, 9-34% in der Leber und 0,03-16 % in den restlichen Organen.
Cystoisospora rivolta-Dormozoiten waren bis 164 Tage p.i. mit der tryptischen Verdauung nachzuweisen und blieben für die Katze infektiös. Eine Vermehrung dieser Wartestadien in der Maus findet nicht statt. Ihre orale Übertragung von Maus zu Maus ist in den ersten 7 Tagen der Infektion möglich; diese "Passage"-Stadien bleiben für die Katze infektiös. Eine diaplazentare Übertragung findet nicht statt.
In orientierenden Untersuchungen wurden Dormozoiten durch Sulphamethoxypiridazin und Pyrimethamin nicht beeinflusst.

Brösigke, Sabine: Investigations of extraintestinal stages (dormozoites) of Cystoisospora rivolta of the cat in the mouse

Summary

Extraintestinal stages of Cystoisospora rivolta in mice orally administered 10^5-10^7 oocysts could be found directly in their organs which were digested by trypsin, sporadically in stained imprints, smears, and histological sections as well as indirectly by feeding the organs to cats.
In tryptically digested material dormozoites are banana-shaped, in some cases motile, and measure 15,5 x 4,6 µm; sheaths (parasitophorous vacuoles) occurred 7 days post infectionem.
Dormozoites have a special predilection for mesentery, spleen, liver, Peyer's patches, seldom heart and lungs. At a given infectious dose of 10^5 oocysts per mouse there were found 26-67 % in the mesentery, 7-50 % in the spleen, 9-34 % in the liver, and 0,03-16 % in the remaining organs.
Dormozoites of Cystoisospora rivolta could be detected until 164 days p.i. by tryptic digestion and remained infective for cats. In the mouse multiplication of these diapause stages does not take place. Their oral transmission from mouse to mouse is possible during the first 7 days of the infection; these "passage"-stages remain infective for cats. A placental transmission does not occur.
As some instructive examinations showed dormozoites were not affected by sulphamethoxypiridazine plus pyrimethamine.

VI. Literaturverzeichnis

1. Apt,W., A.Atias, E.Thiermann, M.Lorca, J.Olguin (1978): Effect of three coccidiostatics against toxoplasmosis in mice.
Infection 6, 144

2. Dubey,J.P. (1975 a): Experimental Isospora canis and Isospora felis infection in mice, cats and dogs.
J. Protozool. 22, 416-417

3. Dubey,J.P. (1975 b): Isospora ohioensis sp.n. proposed for I.rivolta of the dog.
J. Parasit. 61, 462-465

4. Dubey,J.P. (1977): Taxonomy of Sarcocystis and other coccidia of cats and dogs.
J. Am. Med. Assoc. 170, 778-782

5. Dubey,J.P. (1978): Life-cycle of Isospora ohioensis in dogs.
Parasitology 77, 1-11

6. Dubey,J.P. (1979): Life cycle of Isospora rivolta (Grassi, 1879) in cats and mice.
J. Protozool. 26, 433-443

7. Dubey,J.P., J.K.Frenkel (1972): Extraintestinal stages of Isospora felis and Isospora rivolta (Protozoa: Eimeriidea) in cats.
J. Protozool. 19, 89-92

8. Dubey,J.P., R.H.Streitel (1976): Isospora felis and Isospora rivolta infections in cats induced by mice or oocysts.
Br. Vet. J. 132, 649-651

9. Dubey,J.P., H.Mehlhorn (1978): Extraintestinal stages of Isospora ohioensis from dogs in mice.
J. Parasit. 64, 689-695

10. Euzeby,J. (1980): Les coccidies parasites du chien et du chat: incidences pathogeniques et épidémiologiques.
Revue Méd. vét. 131, 43-61

11. Fayer,R. (1980): Epidemiology of protozoan infections: The Coccidia.
Vet. Parasit. 6, 75-103

12. Fayer,R., J.K.Frenkel (1979): Comparative infectifity for calves of oocysts of feline coccidia: Besnoitia,Hammondia,Cystoisospora,Sarcocystis and Toxoplasma.
J. Parasit. 65, 756-762

13. Ferguson,D.J.P., A.Birch-Andersen, W.M.Hutchinson, J.Chr.Siim (1980): Ultrastructural observations showing enteric multiplications of Cystoisospora (Isospora) felis by endodyogeny.
Z. Parasitenkd. 63, 289-291

14. Frenkel,J.K. (1974): Advances in the biology of Sporozoa.
Z. Parasitenkd. 45, 125-162

15. Frenkel,J.K. (1977): Besnoitia wallacei of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia.
J. Parasit. 63, 611-628

16. Frenkel,J.K., J.P.Dubey (1972): Rodents as vectors for feline coccidia, Isospora felis and Isospora rivolta.
J. Inf. Dis. 125, 69-72

17. Heine,J. (1981): Die tryptische Organverdauung als Methode zum Nachweis extraintestinaler Stadien bei Cystoisospora spp.-Infektionen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 103-104

18. Hernandez,S., R.Navarrete, R.Calero, C.Becerra, F.Martinez (1978): Electron microscopical study of extraintestinal stages of Isospora lacazei in Carduelis carduelis.
4 th Intern. Congr. Parasitology Warsaw,B,19-26

19. Heydorn,A.O. (1979): Die Katze als Überträger zystenbildender Kokzidien.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 214-220

20. Jones,T.C., S.Yeh, J.G.Hirsch (1972): The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite.
J. Exp. Med. 136, 1157-1172

21. Levine, N.D. (1977): Nomenclature of Sarcocystis in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat.
J. Parasit. 63, 36-51

22. Markus,M.B. (1975): Studies on isosporan coccidia of mammals, including man.
PH. D. Thesis, University of London

23. Markus,M.B. (1976): A term for extraintestinal stages of mammalian Isospora (Protozoa, Coccidia, Eimeriidae).
S. Afr. J. Sci. 72, 220

24. Markus,M.B. (1978): Terminology for invasive stages of Protozoa of the subphylum Apicomplexa (Sporozoa).
S. Afr. J. Sci. 74, 105-106

25. Mehlhorn,H., M.B.Markus (1976): Electron microscopy of stages of Isospora felis of the cat in the mesenteric lymph node of the mouse.
Z. Parasitenkd. 51, 15-24

26. Mehlhorn,H., J.K.Frenkel (1980): Ultrastructural comparison of cysts and zoites of Toxoplasma gondii, Sarcocystis muris, and Hammondia hammondi in skeletal muscle of mice.
J. Parasit. 66, 59-67

27. Rommel,M. (1978): Vergleichende Darstellung der Entwicklungsbiologie der Gattungen Sarcocystis, Frenkelia, Isospora, Cystoisospora, Hammondia, Toxoplasma und Besnoitia.
Z. Parasitenkd. 57, 269-283

28. Rommel,M., S.Zielasko (1981): Untersuchungen über den Lebenszyklus von Isospora burrowsi (TRAYSER und TODD, 1978) aus dem Hund.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 87-90

29. Wolters,E., A.O.Heydorn, C.Laudahn (1980): Das Rind als Zwischenwirt von Cystoisospora felis.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 207-210

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft, mit der er die vorliegende Arbeit unterstützte.

Herrn Dr. J. Heine möchte ich für seine Anleitung, wertvolle Hilfe und Geduld danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes, die mir bei der technischen Durchführung der Arbeit behilflich waren.

Lebenslauf

Name	Sabine Brösigke, geb. 25.6.1954 in Friedrichroda
Eltern	Wilhelm Brösigke Charlotte Brösigke, geb. Uhlmann
Schulen	1960-1964 Volksschule in Göggingen 1964-1973 Maria-Theresia-Gymnasium in Augsburg Juni 1973 Abitur, math-naturwiss. Zweig
Studium	1973-1978 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian Universität München
Staatsexamen	November 1978
Approbation	November 1978
Beruf	Jan.-Nov. 79 Assistent bei Dr. Großklaus, Dasing Nov.79-Juni 80 Assistent bei Dr.Artmeier, Augsburg
Promotions-studium	Seit Juli 1980 im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie unter Leitung von Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.Boch